Contenidos del Kit

20 X Histosonda EBER CEM-0001
20 X Proteinasa K CEM-E-PK 1X
2 X Anti-Digoxina CEM-A-DIG 1X

Ensayo para 20 determinaciones individuales presentadas en viales liofilizados

Clasificación del producto:

Países miembros de la Unión Europea: "Para Utilización en el Diagnóstico In Vitro"

Países que no pertenecen a la Unión Europea: "Para Uso Exclusivo en Investigación"

INTRODUCCIÓN

El virus de Epstein-Barr es un miembro de los gammaherpes virus (HHV-4). Es un virus lineal de ADN de doble cadena con 184.000 pares de bases. Es el primer virus que se descubrió como oncogénico (1).

La primoinfección por este virus puede tener la sintomatología de un cuadro viral leve o bien mostrarse como el cuadro clínico conocido como Mononucleosis Infecciosa.

Las células diana más habituales para el virus de Epstein-Barr son el linfocito B y la célula epitelial nasofaríngea. El virus de Epstein-Barr infecta de forma masiva a la población humana y estudios

seroepidemiológicos demuestran que el 90% de los humanos adultos han sido infectados por este virus (2).

Los linfocitos B infectados de forma latente expresan, entre otros genes, de forma abundante (104 -105 copias) una cadena corta de RNA no poliadenilado que no se traduce a proteína y que consta de dos segmentos conocidos como EBER 1 y EBER 2. La expresión de EBER (Epstein-Barr virus encoded RNAs) es nuclear.

Aunque básicamente se desconoce la función de EBER se piensa que puede tener un papel en la oncogénesis producida por el virus (3).

Los tumores humanos relacionados con el EBV son numerosos y varían desde el Carcinoma Nasofaríngeo Indiferenciado hasta el Linfoma de Burkitt africano, la Enfermedad de Hodgkin Celularidad Mixta, algunos linfomas B, T y NK y en procesos linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia (4).

FINALIDAD PREVISTA

Para uso en el Diagnóstico In Vitro.

El Kit Histosonda EBER está indicado para la detección del ARN de EBER 1+2 en células infectadas por el virus de Epstein-Barr tanto en células reactivas como tumorales estando indicado su uso en los tumores anteriormente citados así como en ganglios linfáticos de pacientes con patología reactiva atípica producida por Mononucleosis Infecciosa. Esta detección se lleva a cabo mediante hibridación in situ en secciones histológicas fijadas en formol e incluidas en parafina.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

El Kit Histosonda EBER ha sido diseñado para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional, y debe ser manipulado por personal cualificado y debidamente entrenado.

Para la obtención de unos resultados adecuados, debe seguirse fielmente las instrucciones del manual. Cualquier cambio en las temperaturas o tiempos indicados, o en cualquier otro paso del proceso, puede dar lugar a resultados erróneos.

COMPONENTES DEL KIT

El kit incluye 20 tubos monotest de la Histosonda EBER; 20 tubos monotest de la Proteinasa K y 2 tubos del anticuerpo Anti-Digoxina válidos para 20 tests. Todos los productos son liofilizados según se indica en la etiqueta.

La Histosonda EBER consiste en un segmento de ADN de una sola cadena de 526 nucleótidos, complementaria al EBER expresado. Esta sonda detecta al gen EBER en su totalidad incluyendo EBER 1 y EBER 2. El DNA de la sonda contiene nucleótidos que han sido marcados con Digoxigenina.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos suministrados se almacenan a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. Una vez reconstituidos, la sonda permanecerá estable 2 semanas a 4ºC en un medio libre de DNAasas y la Anti-Digoxina un mes a 4ºC, mientras que la Proteinasa K debe ser utilizada en el momento de la reconstitución.

No utilizar los productos después de la fecha de caducidad indicada en sus etiquetas.

MUESTRAS

Cualquier corte de un bloque de parafina en el cual se desee estudiar la presencia de RNA de EBER. Cortes de 4-6 micrómetros de espesor son adecuados para el estudio. El corte es preferible que sea reciente (no más de treinta días) aunque los resultados del ensayo no se ven afectados por la antigüedad del bloque. Se han realizado estudios en las instalaciones del fabricante utilizando bloques de parafina de 20 años de antigüedad con óptimos resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Al igual que para el control positivo, las muestras en las que se observe expresión de EBER deberán mostrar una coloración marrón en el núcleo celular que contrastará sobre el fondo azul-violeta que confiere la tinción con hematoxilina. El facultativo valorará los resultados en base a su experiencia a partir de la visualización de las señales observadas en la muestra, en paralelo con las señales observadas en las muestras de control positivo y control negativo.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

El Kit Histosonda EBER ha sido optimizado para detectar la expresión de EBER en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. No se recomienda la utilización de otro tipo de muestras o de técnicas de preparación.

El funcionamiento del kit ha sido validado utilizando los protocolos indicados en el manual de instrucciones.

La utilización de otros procedimientos o las modificaciones de los protocolos recomendados, pueden conducir a resultados erróneos.

Los resultados de este ensayo deben ser evaluados por el facultativo en combinación con el resto de datos clínicos del paciente de los que se disponga.

Para la obtención de unos resultados óptimos y reproducibles es muy importante ajustarse rigurosamente a las condiciones de tiempos y temperaturas indicadas en el procedimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1) Epstein M, Achong B, Barr Y. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblast from Burkitt's lymphoma. J.Exp.Med. 1965; 121:761-770.

2) Henle G, Henle W, Clifford P, et al. Antibodies to EB virus in Burkitt's lymphoma and control groups. J. Nat. Cancer Inst. 1969; 43: 1147-1157.

3) Komano,J,S. Maruo,K. Kurozumi,t. Oda,K. Takada. 1999. Oncogenic role of Epstein-Barr virus encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. J. Virol 73: 9827-31.

4) Elaine S. Jaffe, Nancy Lee Harris, Harald Stein, James W. Vardiman. 2001. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (World Health Organization Classification of Tumours). IARC Press. Chapters 6,7,8.

Fecha de emisión: 01/03/2010

INSTRUCCIONES DE USO

Para la utilización de las sondas marcadas con Digoxigenina

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Hibridación In Situ Cromogénica (CISH), es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN, o estudiar la expresión de un gen así como la evaluación simultánea de la morfología del tejido mediante el uso de microscopía de campo claro.

La sonda marcada, de secuencia conocida, se hibrida con su diana en el tejido problema. Esta unión se detecta mediante un proceso inmunohistoquímico.

Las Histosondas, cuya diana es el RNA mensajero, están destinadas a hacer visibles los genes que se expresan detectando la expresión génica.

Protocolo de HistoSonda

Antes de comenzar, precaliente la cámara húmeda a 62ºC.

Reconstitución de la sonda

1. Añada 65µl de agua destilada (de buena calidad) al vial de Histosonda, dé un pequeño vórtex y centrifugue si fuese necesario.

Desparafinación

1. Caliente los portaobjetos a 62ºC durante 10mins utilizando una placa caliente o un incubador.
2. Introduzca los portaobjetos en el siguiente orden en:

a. Xileno: 10 mins
b. Xileno: 5mins
c. Alcohol absoluto (etanol o isopropanol): 1min X 2 veces
d. Alcohol 96%: 1min X 3 veces
e. Metanol con 0.3% H_2O_2 o 3% H_2O_2 solo: 5mins

3. Lave enérgicamente los portaobjetos con agua (destilada o corriente), manténgalos en agua 1min.

Inhibición de uniones inespecíficas de DNA (opcional)

Por lo general este paso no es necesario, a menos que el tejido que vaya a hibridar contenga una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos (generalmente médula ósea y tejidos gástricos).

1. Coloque los portaobjetos en 200 ml de agua destilada en un microondas hasta que el líquido hierva de manera uniforme (normalmente unos 2 min).
2. Cambie los portaobjetos inmediatamente a agua a temperatura ambiente.
3. Como alternativa puede introducir los portaobjetos en agua destilada hirviendo durante 30 segundos e inmediatamente transfiéralos a agua destilada a temperatura ambiente.

¡Importante: un tratamiento térmico excesivo puede provocar una tinción de fondo. Saque los portaobjetos de manera inmediata.

Desproteinización

1. Reconstituya la Proteinasa K de Cenbimo con 200µl de agua destilada (1 vial por cada portaobjetos).
2. Retire el exceso de agua de cada portaobjetos con un pañuelo de papel.
3. Cubra el tejido con 200µl de Proteinasa K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave enérgicamente con agua.
5. Introduzca los portaobjetos en PBS pH 7.4 durante 2mins.

(Importante: si los cortes han sido tratados previamente con calor en microondas, use la Proteinasa K sólo durante 5 minutos, ya que este tratamiento sensibiliza mucho los tejidos para esta enzima. Las médulas óseas fijadas en ácido fórmico o EDTA requieren una digestión de 20 min a 55ºC con Proteinasa K)

Incubación con la sonda

1. Retire el exceso de buffer del portaobjetos con un pañuelo de papel.
2. Añada los 65µl de la sonda al corte asegurándose de que todo el tejido queda cubierto y de que no quedan burbujas de aire.
3. Coloque los cristales en posición horizontal en una cámara húmeda y cierre bien.
4. Incube a 62ºC durante 1 h.
5. Si no dispone de una cámara húmeda apropiada, ponga una gota (65µl) de sonda sobre un cubreobjetos de 24x50 mm y colóquelo sobre el tejido. Selle los bordes del cubreobjetos con pegamento. Incube en una estufa a 62ºC o en una placa caliente durante una hora. Después de la incubación, retire con cuidado el pegamento y el cubreobjetos y continúe con el protocolo.

Lavado de la sonda

1. Lave la superficie del tejido vigorosamente con PBS pH 7.4 para retirar toda la sonda.
2. Agite en PBS durante 5mins.

Revelado de la sonda

Protocolo para el revelado manual de la sonda. Como alternativa puede utilizar un aparato automático de inmunohisoquímica.

1. Reconstituya el anticuerpo Anti-Digoxina de Cenbimo con 1 ml de agua destilada. Cada vial es válido para 10 portaobjetos.
2. Retire el exceso de buffer de los cortes como anteriormente.
3. Cubra el tejido con 100 µl de Anti-Digoxina e incube en una cámara húmeda durante 30mins a temperatura ambiente.
4. Lave enérgicamente con PBS, y agite en PBS pH 7.4 y agite en PBS durante 1min.
5. Retire el exceso de buffer de los cortes.
6. Ponga una gota de un polímero comercial anti-ratón HRP sobre el tejido (suficiente para cubrir todo el tejido 50-100µl) e incube en una cámara húmeda siguiendo las instrucciones del fabricante.
7. Lave vigorosamente con PBS, agite en PBS durante 1min.
8. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.
9. Lave con agua.
10. Tiña los cortes brevemente (2-3secs) con hematoxilina Harris diluída al 50% en agua.
11. Lave con agua, deshidrate y haga el montaje de los cristales siguiendo los protocolos habituales del laboratorio.

www.cenbimo.com
www.histosonda.com

AENOR ER Gestión Calidad Productos Sanitarios UNE-EN ISO 13485 GS-0009/08
AENOR ER Empresa Registrada UNE-EN ISO 9001 ER-0051/08
AENOR Producto Certificado Proyecto I+D+I 068/0657/07

IVD CE 15º C 30º C

Fabricante: CENBIMO S.L.
C/ Doctor Iglesias Otero, s/n
27004 Lugo, Spain

Kit Contents

20 X Histosonda EBER CEM-0001
20 X Proteinase K CEM-E-PK 1X
2 X Anti-Digoxin CEM-A-DIG 1X

Assay for 20 individual reactions in lyophilized vials.

Product classification:

EU countries: "For In Vitro Diagnostics"

Non- EU countries:
"For Research Use Only"

INTRODUCTION

The Epstein-Barr virus is a member of the gamma-herpes viruses (HHV-4). It is a linear 184,000 base pair double stranded DNA virus and was the first virus to be discovered as oncogenic (1).

Primoinfection by this virus can show signs of a slight viral infection or it can present as Infectious Mononucleosis. The most common target cells for the Epstein-Barr virus are the B lymphocyte and nasopharyngeal epithelial cell.

The Epstein-Barr virus massively infects the human population and sero-epidemiological studies show that 90% of adults have been infected by this virus (2).

Latently infected B lymphocytes express abundantly (104 -105 copies) among other genes, a short nonpolyadenylated chain of RNA that does not transduce to a protein, consisting of two fragments know as EBER 1 and EBER 2. The expression of EBER (Epstein-Barr virus encoded RNAs) is nuclear. Although the function of EBER is unknown, it is believed that it may play a role in virus-produced oncogenesis (3).

There are numerous human tumors associated with EBV, ranging from non-differentiated nasopharyngeal carcinoma to African Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease Mixed cellularity to some B, T and NK lymphomas, as well as lymphoproliferative processes associated with immunodeficiency(4).

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis

The Kit Histosonda EBER is intended for the detection of EBER 1+2 RNA in cells infected by the Epstein-Barr virus, in both reactive and tumoral cells. Its use is intended for the aforementioned tumors, and also in lymph nodes of patients with atypical reactive pathology as produced by Infectious Mononucleosis. This detection is carried out by in situ hybridization in paraffin-embedded, formalin-fixed histological sections.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The Kit Histosonda EBER has been designed for professional use in In Vitro Diagnosis and must be manipulated by qualified and accordingly trained personnel.

In order to obtain the best results, the instructions contained in the manual must be followed. Any change to the indicated temperatures, times or any other step of the process can lead to poor results.

KIT COMPONENTS

The Kit includes 20 single test tubes of Histosonda EBER; 20 single test tubes of Proteinase K and 2 tubes of Anti-Digoxin antibody sufficient for 20 tests in total. All products are lyophilized.

Histosonda EBER consists of a fragment of single stranded DNA of 526 nucleotides, complementary to expressed EBER. This probe detects the EBER gene in full, including EBER 1 and EBER 2. The DNA of the probe contains nucleotides that have been labeled with Digoxigenin.

STORAGE CONDITIONS

Supplied reagents are stored at room temperature until their expiration date. After being reconstituted the probes will remain stable for two weeks at 4ºC in a DNAase-free environment. The Anti-Digoxin can be stored at 4ºC for 1 month and the Proteinase K must be used immediately and cannot be stored. Do not use these products after their expiration dates.

SAMPLES

Any paraffin block section in which EBER presence is to be studied. Sections of 4-6 micrometers in width are sufficient to conduct the study. Preferably, the cut should be recent (no more than thirty days old). Assay results are not affected by block age. Studies have been carried out in the manufacturers' laboratories using 20 year old paraffin blocks with optimal results.

INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which EBER expression is observed will show a brownish color in cell nucleus, which will contrast over the blue-violet background given by hematoxylin staining. The pathologist will evaluate the results according to their experience, drawing conclusions from the staining of the sample in parallel with the staining observed in positive and negative controls.

ASSAY LIMITATIONS

The Kit Histosonda EBER has been optimized to detect RNA expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Its use is not recommended for other types of samples or preparation techniques.

The correct operation of this kit has been validated using the protocols indicated in the instructions manual. The use of other procedures or modification of the recommended protocols may lead to erroneous results. The results from this assay must be evaluated by the pathologist in combination with the rest of the available patient clinical data.

In order to obtain optimal and reproducible results it is important to rigorously maintain the time and temperature conditions indicated in the procedure.

BIBLIOGRAPHY

1) Epstein M, Achong B, Barr Y. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblast from Burkitt's lymphoma. J.Exp.Med. 1965; 121:761-770.

2) Henle G, Henle W, Clifford P, et al. Antibodies to EB virus in Burkitt's lymphoma and control groups. J. Nat. Cancer Inst. 1969; 43: 1147-1157.

3) Komano,J,S. Maruo,K. Kurozumi,t. Oda,K. Takada. 1999. Oncogenic role of Epstein-Barr virus encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. J. Virol 73: 9827-31

4) Elaine S. Jaffe, Nancy Lee Harris, Harald Stein, James W. Vardiman. 2001. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (World Health Organization Classification of Tumours). IARC Press. Chapters 6,7,8.

Emission date: 01/03/2010

PROCEDURE

For Digoxigenin- labeled probes

BASIS OF THE METHOD

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) is a technique used to determine the presence of a DNA or RNA sequence or to study gene expression, as well as for the simultaneous evaluation of tissue morphology by white light microscopy. A labeled probe of known sequence hybridizes with its target in the tissue being studied. This hybridization is then detected by an immunohistochemical process.

The Histosondas targets are messenger RNA and they are therefore designed to detect and visualise gene expression.

HistoSonda Protocol

Before starting pre-heat the humid chamber to 62ºC.

1. Reconstitute the probe

1. Add 65µl of (good quality) distilled water to the HistoSonda tube, briefly vortex and centrifuge if possible.

2. Deparaffinization

1. Heat slides at 62ºC for 10mins using a hot plate or incubator.
2. Immerse slides in:
a. Xylene: 10 mins
b. Xylene: 5mins
c. Absolute alcohol (ethanol or isopropanol): 1min X 2
d. Alcohol 96%: 1min X 3
e. Methanol containing 0.3% H2O2 or 3% H2O2 only :5mins
3. Wash well with distilled water, leave standing in water.

2b. Inhibition of unspecific DNA binding (optional)

Generally this step is not necessary unless the tissue to be hybridized contains a great quantity of polymorphonuclear eosinophil leukocytes (generally bone marrow and gastric tissues).

1. Place slides in 200ml distilled water in a microwave until the liquid boils uniformly (normally around 2mins).
2. Immediately transfer slides to distilled water at room temperature.
3. Alternatively place slides in boiling distilled water for 30 seconds and immediately transfer to distilled water at room temp.

! Important: excess heat treatment will result in background staining. Remove slides immediately. !

3. Deproteinization

1. Reconstitute Proteinase K from Cenbimo with 200µl of distilled water (1 vial for each slide).
2. Remove excess water from individual slides with tissue paper.
3. Cover tissue sections with the 200 µl of Proteinase K and incubate in a humid chamber for exactly 10mins at room temp.
4. Wash well with water.
5. Transfer to PBS pH 7.4 for 2mins.

! (Important: if the slides have been boiled in the microwave previously only use Proteinase K for 5 minutes as the heat treatment will have significantly sensitized the tissue sections. For bone marrows continue to use 10mins after heat treatment. Bone marrows fixed in formic acid or EDTA require a Proteinase K digestion of 20min at 55ºC.) !

4. Incubation with the probe

1. Remove excess buffer from sections as described previously.
2. Add the 65µl of probe to the tissue section ensuring the entire section is completely covered and avoiding air bubbles.
3. Place the slides in a horizontal position in a humid chamber and close well.
4. Incubate at 62ºC for 1hr.
5. If no suitable humid chamber is available drop the 65µl of probe over a 24 X 50 mm coverslip and place over the tissue section. Seal the edges of the coverslip with rubber cement. Incubate in a 62ºC incubator or over a hot plate for 1 hour. After incubation carefully remove the rubber cement and coverslip and continue the protocol.

5. Washing the probe

1. Wash the surface of the section vigorously with PBS pH 7.4 to remove the probe.
2. Agitate in PBS for 5mins.

6. Revealing the probe

Protocol for manual revealing of the probe. Alternatively, an automatic immunohistochemistry apparatus may be used.

1. Reconstitute Anti-Digoxin from Cenbimo with 1ml of distilled water. Each vial is valid for 10 slides.
2. Remove excess buffer from sections as before.
3. Cover sections with 100µl of Anti-Digoxin and incubate in a humid chamber for 30mins at room temp.
4. Wash vigorously with PBS, pH 7.4 agitate in PBS for 1min.
5. Remove excess buffer from sections.
6. Drop commercial polymer anti-mouse HRP over the sections (enough to cover the tissue 50-100µl) incubate in a humid chamber following the manufacturer's instructions.
7. Wash vigorously with PBS, agitate in PBS 1min.
8. Remove excess buffer from sections and apply commercial Diaminobenzidine (DAB) following the manufacturer's instructions.
9. Wash with water.
10. Counter stain the sections briefly (2-3secs) with Harris hematoxylin diluted 50% in water.
11. Wash with water, dehydrate and cover slip following normal laboratory protocols.

www.cenbimo.com
www.histosonda.com

AENOR ER Gestión Calidad Productos Sanitarios UNE-EN ISO 13485 GS-0009/08
AENOR ER Empresa Registrada UNE-EN ISO 9001 ER-0051/08
AENOR Producto Certificado Proyecto I+D+I 068/0657/07

IVD CE 15º C 30º C

Fabricante: CENBIMO S.L.
C/ Doctor Iglesias Otero, s/n
27004 Lugo, Spain